

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08325293 A**

(43) Date of publication of application: **10.12.96**

(51) Int. Cl

**C07K 14/52**  
**C12P 21/02**  
**// A61K 38/00**  
**C12N 15/09**  
**(C12P 21/02 , C12R 1:19 )**

(21) Application number: **07175539**

(22) Date of filing: **19.06.95**

(30) Priority: **21.06.94 JP 06162874**  
**31.03.95 JP 07 99979**

(71) Applicant: **SUMITOMO ELECTRIC IND LTD**

(72) Inventor: **HIRAI YOHEI**  
**KOSHIDA SHOGO**  
**OKA YUMIKO**

**(54) MODIFIED SUBSTANCE OF EPIMORPHINE**

**(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a new modified substance of epimorphine, comprising a hydrophilic peptide containing a specific number of amino acids containing a functional region of the epimorphine added thereto, retaining the epimorphine activities and useful for treatment, etc., of malformation diseases of an epithelial tissue.

**CONSTITUTION:** This new modified substance of epimorphine comprises a hydrophilic peptide, comprising amino acids in a number within the range of 50=99 and containing at least 5 continuous histidine residues added to at least one terminal of a polypeptide containing a functional domain of the epimorphine and the functional domain of the epimorphine is obtained by removing a coiled coil region on the N-terminal side, a coiled coil region on the C-terminal side and a hydrophobic region on the C-terminal side from the full length of the epimorphine. The modified substance is capable of retaining the activities of the epimorphine at a high level, can readily be prepared and purified and is further useful

for elucidating the onset mechanism of diseases due to the malformation of an epithelial tissue, developing a therapy or a therapeutic agent for the diseases, treating burns or various tissues after the operation, an ingredient, etc., of an artificial organ, a cosmetic, a hair growth agent, etc.

**COPYRIGHT: (C)1996,JPO**

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-325293

(43) 公開日 平成8年(1996)12月10日

| (51) Int.Cl. <sup>8</sup> | 識別記号  | 庁内整理番号  | F I           | 技術表示箇所  |
|---------------------------|-------|---------|---------------|---------|
| C 0 7 K 14/52             | Z N A | 8517-4H | C 0 7 K 14/52 | Z N A   |
| C 1 2 P 21/02             | Z N A |         | C 1 2 P 21/02 | Z N A C |
| // A 6 1 K 38/00          | A D A |         | A 6 1 K 37/02 | A D A   |
| C 1 2 N 15/09             |       | 9162-4B | C 1 2 N 15/00 | A       |
| (C 1 2 P 21/02            |       |         |               |         |

審査請求 未請求 請求項の数14 F D (全 19 頁) 最終頁に続く

|              |                 |          |  |
|--------------|-----------------|----------|--|
| (21) 出願番号    | 特願平7-175539     | (71) 出願人 | 000002130<br>住友電気工業株式会社<br>大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 |
| (22) 出願日     | 平成7年(1995)6月19日 | (72) 発明者 | 平井 洋平<br>神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電<br>気工業株式会社横浜製作所内  |
| (31) 優先権主張番号 | 特願平6-162874     | (72) 発明者 | 越田 将悟<br>神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電<br>気工業株式会社横浜製作所内  |
| (32) 優先日     | 平6(1994)6月21日   | (72) 発明者 | 岡 由美子<br>神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電<br>気工業株式会社横浜製作所内  |
| (33) 優先権主張国  | 日本 (J P)        | (74) 代理人 | 弁理士 西川 繁明                                      |
| (31) 優先権主張番号 | 特願平7-99979      |          |  |
| (32) 優先日     | 平7(1995)3月31日   |          |  |
| (33) 優先権主張国  | 日本 (J P)        |          |  |

## (54) 【発明の名称】 エピモルフィン改変体

## (57) 【要約】

【目的】 エピモルフィンの活性を高度に保持し、しかも調製及び精製が容易なエピモルフィン改変体及びその変異体を提供すること。

【構成】 エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドの少なくとも一方の端部に5～99個の範囲のアミノ酸よりなる親水性ペプチドが付加されていることを特徴とするエピモルフィン改変体。前記エピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされた変異エピモルフィン改変体。前記エピモルフィン改変体またはその変異体をコードするDNA。分子間架橋されて複合体化されたエピモルフィン改変体。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドの少なくとも一方の端部に5～99個の範囲のアミノ酸よりなる親水性ペプチドが付加されていることを特徴とするエピモルフィン改変体。

【請求項2】 エピモルフィンの機能ドメインが、エピモルフィン全長からN末端側のコイルドコイル領域

(1)、C末端側のコイルドコイル領域(3)、及びC末端側の疎水性領域を削除したものである請求項1記載のエピモルフィン改変体。

【請求項3】 エピモルフィンがヒトエピモルフィンであって、エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、少なくともヒトエピモルフィンのN末端側より104～187番目のアミノ酸配列を含有するものである請求項1記載のエピモルフィン改変体。

【請求項4】 エピモルフィンがマウスエピモルフィンであって、エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、少なくともマウスエピモルフィンのN末端側より105～188番目のアミノ酸配列を含有するものである請求項1記載のエピモルフィン改変体。

【請求項5】 エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の少なくとも一部のアミノ酸を削除したものである請求項2ないし4のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項6】 エピモルフィンがヒトエピモルフィンであって、ヒトエピモルフィン全長のN末端側から29個から103個までの範囲のアミノ酸を削除したものである請求項5記載のエピモルフィン改変体。

【請求項7】 エピモルフィンがマウスエピモルフィンであって、マウスエピモルフィン全長のN末端側から30個から104個までの範囲のアミノ酸を削除したものである請求項5記載のエピモルフィン改変体。

【請求項8】 エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長からC末端側の疎水性領域を削除したものである請求項2ないし7のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項9】 エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長からC末端側の疎水性領域を削除すると共に、C末端側よりそのコイルドコイル領域(3)の少なくとも一部のアミノ酸を削除したものである請求項2ないし7のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項10】 親水性ペプチドが、結合親水性アミノ酸を50%以上の割合(個数基準)で含有するものである請求項1ないし9のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項11】 親水性ペプチドが、下記の(a)～(h)で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれた少なくとも1つのアミノ酸配列を含有するものである請

求項1ないし10のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

(a) Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala

(b) Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn

(c) Glu-Tyr-Lys-Glu-Glu-Glu-Glu-Lys

(d) Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys

(e) Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys

(f) Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly-Arg

(g) Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp

(h) Gly-Ala-Pro-Val-Pro-Tyr-Asp-Pro-Leu-Glu-Pro-Arg

20 【請求項12】 親水性ペプチドが、少なくとも5個の連続したヒスチジン残基を含有するものである請求項1ないし10のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項13】 請求項1ないし12のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、該エピモルフィン改変体の元の配列が有する機能を保持する程度に、部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされた変異エピモルフィン改変体。

30 【請求項14】 分子間架橋されて複合体化されたものである請求項1ないし12のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、間充細胞に存在し、上皮組織の形成を制御するポリペプチドであるエピモルフィンを改変したエピモルフィン改変体に関し、さらに詳しくは、上皮組織の形態異常に起因する疾患の発症機序の解明、これらの疾患の治療法や治療薬の開発等に有用なエピモルフィンを、その活性を保持したまま改変して得られるエピモルフィン改変体に関する。また、本発明は、エピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされた変異エピモルフィン改変体に関する。さらに、本発明は、エピモルフィン改変体及び変異エピモルフィン改変体をコードするDNAに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 上皮組織の正常な組織化及び形態形成は、間充細胞による何らかの制御を受けていること、そして、上皮組織の形態異常に起因する疾患は、そのまわりに存在する間充細胞が原因となる場合が多いこと

から、古くより間充細胞成分についての研究がなされている。しかしながら、上皮組織の形態形成を制御する分子の単離、精製、及びその構造解析についての研究は、内外で盛んに行われているものの、その実体については、ほとんど知られていない状況にあった。

【0003】上皮組織の形態異常に起因する疾患と発症機序の解明ならびに治療法の開発等を実現化するためには、このような上皮組織の形態形成を制御する分子の単離、精製、及びその構造解析等が不可欠の前提であり、当該分子の構造解析等を早期に達成することは、当業界における重要課題となっていた。このような状況の中で、最近、本発明者らは、上皮組織の形態形成を制御する分子（本発明者らは、「エピモルフィン」と命名した）の単離及び同定に成功した（特開平6-25295号）。エピモルフィンは、277ないし289個のアミノ酸からなるタンパク質をコア・タンパク質とし、主として間充細胞により生合成される生理活性物質である。

【0004】本発明者らは、ヒト及びマウスのエピモルフィンの配列を決定することに成功したが、それぞれ遺伝子のスプライシングにより少なくとも3種のタイプが存在することが判明している。ヒトのエピモルフィンには、後記の配列表に示される配列番号1のヒトエピモルフィン、配列番号2のヒトエピモルフィン（アイソフォームA）、及び配列番号3のヒトエピモルフィン（アイソフォームB）の3種が存在する。マウスのエピモルフィンには、後記の配列表に示される配列番号4のマウスエピモルフィン、配列番号5のマウスエピモルフィン（アイソフォームA）、及び配列番号6のマウスエピモルフィン（アイソフォームB）の3種が存在する。ヒトのエピモルフィンとマウスのエピモルフィンとは、アミノ酸レベルで約90%の相同性があり、動物種が異なっても、良く保存されている分子である。

【0005】しかしながら、これらのエピモルフィンは、通常、複雑な高次構造をとりながら、C末端の極端に疎水性の高い領域で細胞膜と強固に結合して機能しているため、活性を高いレベルで保持したままで調製することが極めて難しいという問題があった。特に、エピモルフィン及びアイソフォームAには、その傾向が強い。細胞膜結合部分が存在すると、培養動物細胞により産生させたエピモルフィンを培養液中に分泌させて、分離・精製することが困難である。本発明者らは、C末端の疎水性部分を取り除くなどの方法により、可溶性のエピモルフィン改変体を作成することを提案したが（特開平6-25295号）、これらの方法では、未だ不十分であり、より改良された方法が望まれていた。エピモルフィンの生理活性を保持したままで、調製及び精製が容易なエピモルフィン改変体を得ることができるならば、上皮組織の形態異常に起因する疾患の発症機序の解明ならびに治療法の開発などに有用である。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、エピモルフィンの活性を高度に保持し、しかも調製及び精製が容易なエピモルフィン改変体を提供することにある。また、本発明の目的は、エピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされた変異エピモルフィン改変体を提供することにある。本発明の他の目的は、エピモルフィン改変体及び変異エピモルフィン改変体をコードするDNAを提供することにある。

【0007】本発明者らは、エピモルフィンの構成アミノ酸をコンピュータ解析した結果、図1に示すように、大別して4個の構造上特徴的な領域（ドメイン）に分けられることを見出した。即ち、エピモルフィンポリペプチドは、N末端側より、コイルドコイル領域（1）、機能ドメイン（2）、コイルドコイル領域（3）、及びC末端の疎水性領域に分けることができ、2つのコイルドコイル領域は、さらに幾つかのサブ領域（例えば、heptad repeatとそれ以外の領域）に分けることができる。本発明者らは、エピモルフィンの機能ドメイン（2）を含むポリペプチドのN末端及び／またはC末端に、5～99個の範囲のアミノ酸からなる親水性のペプチドを付加することにより、活性を高いレベルで保持し、簡便に精製され得るエピモルフィン改変体を得られることを見出し、その知見に基づいて本発明を完成するに至った。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】かくして、本発明によれば、エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドの少なくとも一方の端部に5～99個の範囲のアミノ酸よりなる親水性ペプチドが付加されていることを特徴とするエピモルフィン改変体が提供される。また、本発明によれば、エピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、該エピモルフィン改変体の元の配列が有する機能を保持する程度に、部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされた変異エピモルフィン改変体が提供される。さらに、本発明によれば、エピモルフィン改変体及び変異エピモルフィン改変体をコードする各DNAが提供される。

【0009】以下、本発明について詳述する。エピモルフィンは、胎児期の上皮の高次形態形成に必須な間充細胞膜分子であり、生体組織の構築にも関与していると推定される。エピモルフィンは、各種の胎児組織の正常な上皮形成を阻害するモノクローナル抗体MC-1 [Cell, Vol. 69, p. 471-481 (1992)] により認識される抗原分子として同定された膜タンパク質である。

【0010】エピモルフィンは、約280個のアミノ酸からなるタンパク質（分子量約33kDa）である。ヒトエピモルフィンとしては、後記の配列表の配列番号1

のエピモルフィン、配列番号2のエピモルフィンアイソフォームA、及び配列番号3のエピモルフィンアイソフォームBが知られている。マウスエピモルフィンとしては、後記の配列表の配列番号4のエピモルフィン、配列番号5のエピモルフィンアイソフォームA、及び配列番号6のエピモルフィンアイソフォームBが知られている。マウスエピモルフィンは、例えば、モデル動物を用いた上皮組織の形態異常に起因する疾病発生メカニズムの解明等に有用である。ヒトエピモルフィンは、例えば、該疾病の診断・治療等に有用である。

【0011】エピモルフィンは、上皮組織を取り巻く間充細胞中に存在しており、上皮組織の形態形成を制御する等の機能を有している。このようなエピモルフィンは、通常、複雑な立体構造をとりながら、その分子中のC末端の疎水性領域により細胞膜と結合した形で機能している。エピモルフィンのcDNAから予測される物質は、分子量約33kDaの分子であるが、生体内において、この分子は、SDS耐性の複合体を複数種形成し、そのうちの分子量約150kDaの物質が細胞外に分泌してモノクローナル抗体MC-1によって認識されることが判明している。

【0012】エピモルフィンは、コンピュータ解析によれば、図1に示すように、構造上4つの領域に大別することができる。C末端側の疎水性領域（膜貫通ドメイン）を除いた領域は、疎水性アミノ酸が規則正しく並んで（heptad repeats）、いわゆるコイルドコイル構造を取りやすいN、C両末端のフラグメント〔コイルドコイル領域（1）及び（3）〕と、それらとほぼ同じ大きさの中央のフラグメント（2）から構成される。コイルドコイル領域（1）及び（3）は、各々さらに細かく、各2個のheptad repeatsを含む4つのサブフラグメントに分けることができる。

【0013】本発明者らの研究結果によれば、中央フラグメント（2）が機能ドメインであることが判明した。エピモルフィンの中央フラグメント（2）が機能ドメインであることは、モノクローナル抗体MC-1との反応性と細胞接着能により判定することができる。図1に示すように、各フラグメント（1）、（2）、（3）、

（12）、（13）、（23）、（123）、及び（123C：エピモルフィン全長）を常法により大腸菌で作成し、エピモルフィンの機能部位に結合するモノクローナル抗体MC-1との反応性を調べたところ、特にフラグメント（2）及び（23）が強い反応性を示した（参考例1参照）。モノクローナル抗体は、生体内で分泌型エピモルフィンの活性を阻害することから、この中央フラグメント（2）が、エピモルフィンの活性と密接に関わっていると推定される。

【0014】細胞接着能については、例えば、8M尿素に溶解した各フラグメントをそれぞれ細胞培養用に処理されていないディッシュ（dish）にコートし、8M

尿素とPBSにて十分に洗浄して、各フラグメントを薄く均一にコートし、この上に上皮細胞をまきこんでその応答性を調べることにより判定することができる。中央フラグメント（2）をコートしたディッシュのみに種々の上皮細胞が速やかに接着することが分かった。しかも、中央フラグメント（2）と上皮細胞との接着現象は、モノクローナル抗体MC-1を添加することにより阻害されることが判明した。つまり、中央フラグメント（2）の部分が直接細胞に作用することが明らかになっている。

【0015】したがって、中央フラグメント（2）がエピモルフィンの機能ドメインであることは明らかである。そして、エピモルフィン及びこの機能ドメインを含有するフラグメント（ポリペプチド）は、そのエピモルフィン活性を利用して、各種用途に適用することが期待される。ところが、エピモルフィン及び機能ドメインを含むフラグメントには、生理的溶液に対する可溶性の程度が低いものや不溶性のものがある。エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、生理的溶液に対して難溶性のものであったり、あるいは不溶性のものであると、例えば、培養動物細胞により産生させた該ポリペプチドを培養液中に分泌させて、分離・精製することが困難であり、取り扱いや各種用途への展開も困難である。本発明によれば、エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドの少なくとも一方の端部に5～99個の範囲のアミノ酸よりなる親水性ペプチドが付加することにより、高いレベルでエピモルフィン活性を保持し、かつ、生理的溶液に対して可溶性のエピモルフィン改変体を得ることができる。

【0016】エピモルフィンの機能ドメインは、エピモルフィンのアミノ酸配列のコンピュータ解析の結果によれば、ヒトエピモルフィンの場合、エピモルフィン、エピモルフィンアイソフォームA、及びエピモルフィンアイソフォームBに共通して、N末端より99番目のアミノ酸（フェニルアラニン）から189番目のアミノ酸（グルタミン）までのアミノ酸配列を含む領域であることが分かった。その後、より精密に検討した結果、ヒトエピモルフィンの場合、N末端側より104番目から187番目までのアミノ酸配列を含む領域であっても、エピモルフィン活性を示すことが分かった。したがって、ヒトエピモルフィンの場合、機能ドメインは、エピモルフィン全長のN末端側から99～189番目のアミノ酸配列を含むものであり、好ましくはN末端側より104～187番目のアミノ酸配列を含むものである。

【0017】マウスエピモルフィンの場合、機能ドメインとは、エピモルフィン、エピモルフィンアイソフォームA、及びエピモルフィンアイソフォームB共に共通して、N末端より100番目のアミノ酸（システイン）から190番目のアミノ酸（グルタミン）までのアミノ酸配列を含む領域であることが分かった。その後、より精

密に検討した結果、マウスエピモルフィンの場合、N末端側より105番目から188番目までのアミノ酸配列を含む領域であっても、エピモルフィン活性を示すことが分かった。したがって、マウスエピモルフィンの場合、機能ドメインとは、エピモルフィン全長のN末端側から100～190番目のアミノ酸配列を含むものであり、好ましくはN末端側より105～188番目のアミノ酸配列を含むものである。

【0018】エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドは、エピモルフィンの機能ドメインである分子中央部領域を含んでいれば特に限定されるものではなく、さまざまな長さのペプチドであってよく、例えば、エピモルフィン全長のポリペプチドも含まれる。しかし、可溶性と活性の観点から、一般に、エピモルフィン全長からC末端側の疎水性領域（23～24個のアミノ酸からなる領域）を削除することが好ましい。付加する親水性ポリペプチドの種類によっては、機能ドメインの活性をマスクする要因となっているN末端側のコイルドコイル領域（1）の少なくとも一部のアミノ酸（アミノ酸残基またはペプチド）をエピモルフィン全長から削除することが好ましい。可溶性が高く扱い易いエピモルフィン改変体を得るためには、エピモルフィン全長から、C末端側のコイルドコイル領域（3）の少なくとも一部のアミノ酸を削除することが望ましい。N、C両末端側のコイルドコイル領域の少なくとも一部のアミノ酸を削除してもよい。

【0019】特に、エピモルフィンのN末端側のコイルドコイル領域（1）のアミノ酸をN末端側から削除していくと、エピモルフィン活性が高くなる傾向が見られる。したがって、活性の高いエピモルフィン改変体を得るには、エピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域（1）の少なくとも一部のアミノ酸を削除することが好ましい。一方、コイルドコイル領域

（1）のアミノ酸をN末端側から削除していくと、得られるフラグメントの生理的溶液に対する可溶性が低下する傾向が見られる。しかし、このようなフラグメントの少なくとも一方の端部に、親水性ペプチドを付加することにより、高活性を保持したまま可溶性を高めることができる。

【0020】コイルドコイル領域（1）は、ヒトエピモルフィンの場合、エピモルフィン全長のN末端から103個までの領域である。このうち、N末端側より1個から28個までのアミノ酸を削除したフラグメントは、良好な可溶性を保持し、活性を向上させることができる。N末端側より29個から77個までのアミノ酸、さらには、29個から103個までのアミノ酸を削除したものは、高い活性を示すことができる。N末端側より29～103個までの領域は、heptad repeatsを含み、特にコイルドコイル構造を作りやすい領域である。N末端側より30個から98個までの範囲のアミノ

酸を削除してもよい。いずれの場合も、C末端側の疎水性領域を削除することが好ましい。

【0021】コイルドコイル領域（1）は、マウスエピモルフィンの場合、エピモルフィン全長のN末端から104個までの領域である。このうち、N末端側より1個から29個までのアミノ酸を削除したフラグメントは、良好な可溶性を保持し、活性を向上させることができる。N末端側より30個から78個までのアミノ酸、さらには、30個から104個までのアミノ酸を削除したものは、高い活性を示すことができる。N末端側より30～104個までの領域は、heptad repeatsを含み、特にコイルドコイル構造を作りやすい領域である。N末端側より30個から99個までの範囲のアミノ酸を削除してもよい。いずれの場合も、C末端側の疎水性領域を削除することが好ましい。

【0022】コイルドコイル領域（3）は、エピモルフィン全長からコイルドコイル領域（1）、機能ドメイン（2）、及びC末端側の疎水性領域を除く領域であり、エピモルフィンの種及びアイソフォームによって異なる。コイルドコイル領域（3）を削除する場合、アイソフォームでないエピモルフィンでは、通常、エピモルフィン全長からC末端側より25個から99個までの範囲のアミノ酸を削除することが好ましい。エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドに付加させる親水性ペプチドは、エピモルフィン機能部領域の溶解度を向上させ、かつ、その機能発揮をブロックしない程度の大きさの親水性ペプチドであり、具体的には、5～99個の範囲のアミノ酸よりなる親水性ペプチドである。

【0023】アミノ酸は、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸とに大別することができる。親水性アミノ酸としては、グリシン（Gly）、トレオニン（Thr）、トリプトファン（Trp）、セリン（Ser）、チロシン（Tyr）、プロリン（Pro）、ヒスチジン（His）、グルタミン酸（Glu）、グルタミン（Gln）、アスパラギン酸（Asp）、アスパラギン（Asn）、リシン（Lys）、及びアルギニン（Arg）が挙げられる。疎水性アミノ酸としては、イソロイシン（Ile）、バリン（Val）、ロイシン（Leu）、フェニルアラニン（Phe）、システイン（Cys）、メチオニン（Met）、及びアラニン（Ala）が挙げられる。

【0024】本発明で使用する親水性ペプチドは、個数基準で、親水性アミノ酸を通常50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上含有するペプチドである。エピモルフィン改変体を生体内で埋め込み型にするには、安全性の面から抗原性の低い親水性ペプチドが好んで選ばれる。エピモルフィン改変体を生体外で検討する場合には、その検出を容易に行うことができる親水性ペプチドが好んで選ばれる。いずれの場合も、エピモルフィン改変体の精製が簡便に行えるようなアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含ませるように、親水性ペプチドを設計するのが望ましい。

【0025】生体外での検討を行う場合、例えば、下記の(a)～(h)で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸配列を含有する親水性ペプチドを用いると、この親水性ペプチドに対する高感度の抗体が容易に入手できることから、得られたエピモルフィン改変体が再現性よく検出できるようになる。これらの各アミノ酸配列は、1つの親水性ペプチド中に複数個含ませてもよい。

(a) Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala (即ち、YPYDVPDYA)

(b) Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn (即ち、EQKLISEEDLN)

(c) Glu-Tyr-Lys-Glu-Glu-Glu-Glu-Lys (即ち、EYKEEEEK)

(d) Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys (即ち、YTDIEMNRLGK)

(e) Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys (即ち、RIQRGPGRFVTIGK)

(f) Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly-Arg (即ち、ASMTGGQQMGR)

(g) Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp (即ち、QPELAPEDPED)

(h) Gly-Ala-Pro-Val-Pro-Tyr-Asp-Pro-Leu-Glu-Pro-Arg (即ち、GAPVPYDPLEPR)

【0026】エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドのN末端及び/またはC末端に付加する親水性ペプチドは、目的に応じて、大きさ及び種類を自由に選んで組み合わせることが可能である。また、異なる親水性ペプチドを付加させた複数種のエピモルフィン改変体を適宜混合して利用することもできる。付加させる親水性ペプチドに、例えば、5個以上連続したヒスチジン

(His) 残基を含ませれば、調製したエピモルフィン改変体は、ニッケルを固定したカラムを用いて1ステップでの精製が可能となる。

【0027】親水性ペプチドは、エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドのN末端、C末端、あるいはN、C両末端に付加する。片末端に付加させるか、あるいは両末端に付加させるかは、エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドの生理的溶液に対する可溶性やエピモルフィン活性の度合、親水性ペプチドの種類

などによって、適宜決定することができる。エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長の場合には、その両末端に親水性ペプチドを付加することが好ましい。エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、C末端側の疎水性領域を削除したフラグメントである場合には、N末端あるいは両末端に親水性ペプチドを付加することが好ましい。

【0028】エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長のN末端側からコイルドコイル領域(1)のアミノ酸の少なくとも一部を削除したフラグメントである場合には、可溶性の低下を避けるために、N末端あるいは両末端に親水性ペプチドを付加することが好ましい。エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長のN末端側からコイルドコイル領域(1)のアミノ酸の少なくとも一部を削除し、かつ、C末端側の疎水性領域を削除したフラグメントである場合にも、同様にN末端あるいは両末端に親水性ペプチドを付加することが好ましい。エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長のC末端側の疎水性領域を削除し、さらにC末端側のコイルドコイル領域(3)のアミノ酸の少なくとも一部を削除したフラグメントである場合には、C末端あるいは両末端に親水性ペプチドを付加することが好ましい。

【0029】エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドの片端または両端に親水性ペプチドを付加させる方法としては、生化学的手法や遺伝子工学的的手法など各種の手法を採用することができる。生化学的手法を用いた方法としては、エピモルフィン分子自体を化学的あるいは物理的に切断し、機能ドメインを含むフラグメントを得、それを精製した後、化学反応を利用して、該フラグメントのN末端及びまたはC末端に親水性ペプチドを結合させる方法を例示することができる。遺伝子工学的的手法を用いた方法としては、エピモルフィンをコードする遺伝子の一部と、付加する親水性ペプチドをコードする遺伝子とを適当なベクターに組み込んで、宿主で発現させて得る方法を例示することができる。具体的な手法としては、例えば、次に示すような手法が簡便なものとして利用できる。

【0030】まず、エピモルフィンの機能ドメインを含む領域をコードするcDNA(A)をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により合成し、一方、N末端及び/またはC末端に付加すべき親水性ペプチドをコードするDNAと、該エピモルフィン機能ドメインを含む領域のN端及びC端の10ないし20塩基とがつながった一本鎖DNA(B及びC)を、それぞれDNA合成装置により作製する。次に、(A)をテンプレートとし、(B)及び(C)をプライマーとして、PCRにより目的のエピモルフィン改変体をコードする二本鎖DNAを得る。得られたDNAを発現ベクターの適当な部位に組み込んだ

後、大腸菌や動物細胞等の適当な宿主に遺伝子導入を行い、これらの宿主を適当な条件で培養して、導入遺伝子の発現を誘導させることにより、エピモルフィン改変体を調製する。

【0031】本発明のエピモルフィン改変体は、生理的な溶液に容易に溶解できる性質を有しているため、大量生産及び精製が容易であり、しかもエピモルフィン活性を高度に保持している。得られたエピモルフィン改変体は、適当な方法、例えば、アフィニティークロマトグラフィー等により精製した後、そのまま利用することもできるが、化学的に複数のエピモルフィン改変体を分子間架橋させて複合体化させることにより、さらに高活性を発揮させることができる場合がある。この際の架橋は、紫外線（UV）等の照射処理、あるいはグルタルアルデヒドやDSS等の化学物質を用いた化学修飾によって、容易に行うことができる。これらの架橋処理によって、生理的溶液に対する溶解度が低下する場合があるので、例えば、エピモルフィン改変体をプラスチックや金属等の基材にコートして利用する際には、架橋処理をエピモルフィン改変体のコーティング後に行うなどの配慮が必要である。

【0032】エピモルフィン改変体の活性評価の指標としては、例えば、接着細胞数の測定やモノクローナル抗体MC-1との反応性を使用することができる。接着細胞数の測定法としては、例えば、以下の方法が挙げられる。エピモルフィン改変体を8M尿素/Lysisバッファーに懸濁したものを、浮遊培養用ディッシュに塗布し、乾燥後、8M尿素/Lysisバッファーで1回洗い、次いで、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）で5回洗う。次に、培養細胞CH3/10T1/2clone8（大日本製薬社製）を、BSA（ウシ血清アルブミン）20mg/mlを添加したD-MEM/F-12培地（SIGMA D8900）を用いて、ディッシュにまく。一定時間後（例えば、4時間後）にディッシュをPBSで3回洗った後、0.5NのNaOHを用いて細胞を回収し、DNA量を分光光度計で測定することにより、ディッシュに結合した細胞数を測定する。別の方法としては、エピモルフィン改変体を未処理のポリスチレン表面に10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>でコートし、PBSで十分洗浄した後、20mg/mlのBSAを含む無血清培地（ダルベッコMEM）に懸濁したMDCK II細胞（上皮細胞のモデル）をまきこみ、一定時間後（例えば、8時間後）に接着細胞数を調査する方法が挙げられる。これらの方法は、エピモルフィンやエピモルフィンのフラグメントに対しても適用できる。

【0033】エピモルフィン改変体の可溶性（溶解度）評価の指標としては、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）などの生理的溶液に対する可溶性画分の量を使用することができる。具体的には、1mgのタンパク質が1mlのPBSに対して、37℃で溶ける量（可溶性画分）で

評価することができる。したがって、85%が可溶性のものであるとは、1mgのタンパク質に1mlのPBSを添加して混合した場合、37℃で0.85mgが溶けたことを意味する。本発明のエピモルフィン改変体は、エピモルフィン本来の活性を高いレベルで保持しており、医療をはじめとする種々の用途、例えば、火傷や手術後の各種組織の治療や人工臓器等に直接利用できる他、化粧品、育毛剤等の成分としてもそのまま低濃度で利用できるなどの利点がある。

- 10 【0034】本発明のエピモルフィン改変体は、実質的にエピモルフィン活性を保持している限り、そのアミノ酸配列に、部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされた変異体であってもよい。部分的なアミノ酸の置換、欠失及び挿入は、それぞれ単独でなされてもよいが、これらが組み合わされたものであってもよい。部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされるアミノ酸配列の箇所（変異箇所）は、通常、エピモルフィンの機能ドメイン（2）を含むポリペプチドのアミノ酸配列である。この変異箇所は、エピモルフィンの機能ドメイン（2）のアミノ酸配列であってもよい。このような変異体自体は、常法により容易に作成することが可能である。即ち、一般に、蛋白質のアミノ酸配列の一部を置換、欠失または挿入させて、該蛋白質の変異体を得ること自体は、公知の技術であり、例えば、[PCR実験マニュアル]（1991年、HJB出版局）第155～160頁に記載されているリコンビナントPCR法や「実験医学増刊Vol. 8, No. 9」（1990、羊土社）第63～67頁に記載されているPCRを使った変異遺伝子の作製法により行うことができる。本発明の変異エピモルフィン改変体は、細胞接着性などのエピモルフィン改変体が有する機能を実質的に保持しているものであることが好ましい。エピモルフィン改変体をコードするDNAは、エピモルフィン改変体のアミノ酸配列から容易に導き出すことができる。同様に、変異エピモルフィン改変体をコードするDNAは、変異エピモルフィン改変体のアミノ酸配列から容易に導き出すことができる。
- 30

#### 【0035】

- 40 【実施例】以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明する。

- 【0036】[参考例1] エピモルフィンの構成アミノ酸は、図1に示すように、4個の構造上特徴的な領域に分けられることが、コンピュータ解析から明らかになった。なお、コイルドコイル領域（1）及び（3）は、それぞれ更に4つのサブフラグメントに分けることができる。そこでまず、後記の配列番号4で示されるマウスエピモルフィン（全長が289個のアミノ酸からなるポリペプチド）について、各領域に対応するペプチド断片を図1に示すように設計した（図1の下段に1、2、3、12、13、23、123、及び123Cで示す各断
- 50



片)。

【0037】各断片(フラグメント)をコードするcDNAを、マウスエピモルフィンcDNA全長をテンプレートとして、それぞれ別々にPCRにより作成し、発現ベクターPET3C [Gene 56, 125-135 (1987)] のNdeI-BamHIサイトに組み込んだ。得られたベクター/フラグメントcDNAを別々に大腸菌に導入し、IPTGを用いて誘導(1mM、2時間)することにより、それぞれのエピモルフィン・フラグメントを菌内で作成し、大腸菌内の全タンパク質をSDS-PAGEの電気泳動で解析したところ、全てのエピモルフィンフラグメントがほぼ等量作られていることがわかった(図2)。そこで、これらを電気的にニトロセルロースメンブレンにうつし、エピモルフィンの機能部位に結合するモノクローナル抗体MC-1 [Cell 69, 471-481 (1992)] を用いて機能部位を決定したところ、分子中央部の領域がそれに相当することが分かった(図3)。

【0038】機能ドメインを含んでいるフラグメントでも、同時にN末端側の配列を含んでいたり、C末端の23個ないし24個のアミノ酸よりなる疎水性領域をも含んだものは、抗体との反応性が低下し(即ち、機能部位がマスクされ)、機能を円滑に発揮できないことが分かった(図3の12と2、及び123と123Cとの比較)。図1の23で示されるフラグメントを大腸菌から抽出し、精製を試みたところ、C末端より99個までのアミノ酸を除くことで、エピモルフィンの生理的溶液

(PBS)に対する溶解度が有意に増加(95%以上が不溶性から40%が可溶性に)することが明らかになった。即ち、23のフラグメントは、2のフラグメントに比べて溶けにくい、3のフラグメントを取り除くことにより、可溶性が増大する。このようにして得られた結果をもとにして、エピモルフィンの機能発揮には、N末端より100番目から190番目までのアミノ酸配列を含んでおればよく、N末端より30~99個のアミノ酸を順次削除することで、徐々に機能が向上することが、また、C末端より25~99個のアミノ酸を順次削除することで、徐々に水溶性が上がる、それぞれ明らかとなった。

【0039】[実施例1] マウスエピモルフィンの機能ドメインを含むフラグメント(N末端から100~190番目のアミノ酸配列)をコードするcDNAを、参考例1と同様にPCRによって作製し、PET3C [Gene 56, 125-135 (1987)] ベクターのNdeIサイトまたはBamHIサイトに挿入した後、大腸菌に導入して、上記フラグメントのC末端またはN末端に、親水性ペプチドとしてASMTGGQQMGRが付加されたものを作製した。得られたものを精製したところ、いずれも約50%が可溶性のものであった(即ち、溶解度が10%向上した)。同様の操作で、YPY

DVPDYA、EQKLISEEDLN、EYKEEEK、YTDIEMNRLGK、RIQRGPGRFVTIGK、QPELAPEDPED、及びGAPVPYDPLEPRをそれぞれ付加した場合も、5~15%程度の溶解度の向上が認められた。さらに、得られたポリペプチドは、すべて市販の特異抗体での再現性のよい検出が可能であった。

【0040】一方、上記11個のアミノ酸配列(ASMTGGQQMGR)をコードする一本鎖DNAとエピモルフィンの100~115番目のアミノ酸配列をコードするポジティブ鎖のDNAを連結したものをプライマーの一つに選んで作製したcDNAを、上記ベクターのNdeIサイトに挿入し、同様の操作を行うことで、上記エピモルフィン機能フラグメントのN、C両末端に上記11個のアミノ酸が付加したものを作製した。得られたものは、PBSに対して85%以上が可溶性のものであった。上皮細胞のモデルであるMDCKII細胞を培養液(ダルベッコMEMに10%血清添加)に懸濁した後、同量の上記エピモルフィンフラグメントの可溶画分の存在下で8時間インキュベートし、次いで、細胞を洗浄した後、電気泳動させて、細胞に結合したエピモルフィンフラグメントを抗ASMTGGQQMGR抗体(Nobagen社製の抗T7-tagモノクローナル抗体)を用いて検出したところ、N末端及びC末端の両方に上記11個のアミノ酸からなる親水性ペプチドを付加したエピモルフィン機能フラグメント(エピモルフィン改変体)が特に細胞に強固に結合した後、取り込まれていることが明らかになった。

【0041】[実施例2] 前記11個のアミノ酸配列(ASMTGGQQMGR)を3回繰り返しコードする一本鎖DNA(99塩基)をDNA合成機で作製し、ポリメラーゼで2本鎖DNAとした。これを、実施例1で得られたN末端あるいはC末端に上記アミノ酸が付加されたエピモルフィン機能フラグメントをコードするDNAを挿入したPET3Cベクターに、数回繰り返し挿入し、種々の長さのアミノ酸(11、33、66、99、44、76、110)がN、C両末端に付加されたエピモルフィン機能フラグメントを大腸菌で作製した。実施例1と同様にMDCKII細胞を用いて機能を評価したところ、N、C両末端が共に99個のアミノ酸まで付加された場合には、良好な細胞接着能が見られたが、それ以上の長さになると、その細胞接着能が低下する傾向のあることが分かった。

【0042】[実施例3] まず、実施例1と同様の手法で、マウスエピモルフィンの機能ドメイン(N末端から105~188番目のアミノ酸配列)からなるフラグメントのN末端に3~15個の連続したHis残基が付加されたものを大腸菌内で作製した。次に、大腸菌を8M尿素に溶解し、Ni-アガロースカラムでの1ステップの精製を試みたところ、His残基が5個以上連続して

いる親水性ペプチドを付加させた場合に、他の混入物なしの精製が可能であった。

【0043】〔実施例4〕まず、実施例1と同様の手法でマウスエピモルフィンの機能ドメインを含む種々の長さのエピモルフィンフラグメントのN末端に6個の連続したHis残基を付加させたものを作製した。各フラグメントは、図4に示した。図4において、各フラグメントは、次のとおりである。

123：N末端からC末端側の疎水性領域の直前まで

2M：N末端側の30番目のアミノ酸からC末端側の疎水性領域の直前まで

3M：N末端側の79番目のアミノ酸からC末端側の疎水性領域の直前まで

23：N末端側の105番目のアミノ酸からC末端側の疎水性領域の直前まで

2：N末端側の105番目のアミノ酸から188番目のアミノ酸まで

13C：全長から前記フラグメント2を除いたもの

次に、これらをNi-アガロールカラムを用いて精製し、培養用dishにコートしたものを調製した。ここに血管内皮細胞を播種したところ、機能ドメイン（フラグメント2）を含むすべてのペプチドに、血管内皮細胞は速やかに接着した。しかし、エピモルフィン全長から機能ドメインのみを削除したものに対しては、細胞接着は全く認められなかった。また、接着した細胞が分泌する因子の量を調べたところ、フラグメント123にHis残基が付加されたものの活性が最も高いことがわかった。

【0044】〔実施例5〕まず、ポンチでウサギの内耳 \*

|            | エピモルフィン機能フラグメントの両末端に11個のアミノ酸からなる親水性ペプチドを付加したエピモルフィン改変体 | エピモルフィン機能フラグメントの両末端に11個のアミノ酸からなる親水性ペプチドを付加し、DSSにて架橋したエピモルフィン改変体 |
|------------|--|---|
| 2時間後の細胞接着数 | 10%  | 70%   |
| 8時間後の細胞接着数 | 85%  | 90%   |

（脚注）細胞接着数（%）は、まきこんだ細胞の全数を基準（100%）として算出した値である。

【0047】〔実施例7〕

変異エピモルフィン改変体の作成

（A）：マウスエピモルフィンのフラグメント（2）をコードするcDNA。

（B）：（A）のセンス鎖の5'末端の10ないし20塩基である一本鎖DNAに、該一本鎖DNAの5'末端にCATATGCATCATCATCATCATなる配列をつなげた一本鎖DNA。

\*に、直径6mm、深さ1mmの傷をつくり、ここに実施例4で得られたエピモルフィン改変体（フラグメント123を含むペプチド）1～10μgを処理した後、テーピングを施した。1週間後テープをはずしてその部分の切片を作成し、再上皮化率、肉芽形成率、及び新生血管数を調べたところ、損復治癒において有効であることがわかった。実施例4で得られたエピモルフィン改変体（フラグメント3Mを含むペプチド）を用いて同様の結果を得た。したがって、機能ドメインを含むエピモルフィン改変体が、損復治癒において有効であることがわかる。

【0045】〔実施例6〕実施例1で作製した両末端に11個のアミノ酸（ASMTGGQQMGR）からなる親水性ペプチドが付加されたエピモルフィン改変体を、未処理のポリスチレンの表面2カ所に100μg/mlづつコートし、1カ所をDSS（Disuccinimidyl suberate）を用いて架橋した。PBSで十分洗浄後、20mg/mlのBSAを含む無血清培地（ダルベッコMEM）に懸濁したMDCKII細胞をまきこみ、2時間後と8時間後に接着細胞数を調査したところ、架橋した方は、MDCKIIが速やかに、かつ、強固に結合しているのが分かった（表1）。なお、細胞のまきこみを行わずに、SDSを含むサンプルバッファーでコートされたものを溶解、回収し、電気泳動で調べたところ、DSS処理したもののみが多量体を形成していることが確認できた。

【0046】

【表1】

※（C）：（A）のアンチセンス鎖の5'末端側の10ないし20塩基である一本鎖DNAに、該一本鎖DNAの5'末端に制限酵素NheIを認識する塩基配列をつなげた一本鎖DNA。

【0048】（1）（B）及び（C）をDNA合成装置により作成した。

（2）（A）をテンプレートとし、（B）及び（C）をプライマーとして、PCR法により二本鎖DNAを得た。この際、PCR条件は、“Technique— a journal of methods in ce

ll and molecular biology, Vol. 1, No. 1 (August), 1989, p. 11-15"に記載の通り行った。これにより、

(A) の塩基配列の一部に置換変異を持つ変異エピモルフィンフラグメント(2)をコードするDNA(複数)を得た。

(3) 得られたDNAをpET3C(RIKEN DNA Bank RDB519)の2つのEcoRVサイト側の領域を欠失させたもののNdeI、NheIサイトに組み込み、組換えベクターを作成した。次に、このベクターを宿主である大腸菌BL21(RIKEN DNA Bank RDB022)にHanahan法(「ラボマニュアル遺伝子工学」丸善(株)、第107~110頁、1988)により導入した。

【0049】(4) この大腸菌を50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含むLBプレート(1%Bacto tryptone、0.5%Bacto yeast extract、1%NaCl、1.5%Bacto agar)上に巻き込み、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

(5) 生育してくるコロニーが組換えベクターを有する形質転換体であることの確認として、通常のPCR法を行い、目的の変異エピモルフィン改変体をコードするDNAを増幅した後、アガロースゲル電気泳動法でそのバンドを確認する操作を行った。

(6) 得られた形質転換体は、50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含む液体LB培地で37 $^{\circ}$ Cで振盪培養により、大量に増殖させた後、発現を誘導するための物質IPTGを培地中に終濃度1mMになるように添加し、その後2時間振盪培養を続け、種々の変異エピモルフィン改変体が大腸菌内で作成させた。

【0050】(7) (6)の大腸菌をLysisバッファー[50mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA、100mM NaCl]に懸濁して洗い、遠心操作により菌体を沈殿させ、上清を捨てた後、再度回収し、Lysisバッファーに懸濁後Lysozyme(SIGMA L-6876)を1mg/mlになるように添加し、凍結融解を3回繰り返して大腸菌を溶菌させ、超音波処理を行った。その後、遠心操作で上 \*

\* 清を除き、沈殿を2MUrea/Lysisバッファーで4回洗った後、8MUrea/Lysisバッファーに再懸濁し、遠心操作で上清画分を得た。

【0051】[実施例8]

変異エピモルフィン改変体のアミノ酸配列の決定

実施例10の(5)のコロニーの大腸菌内のプラスミドDNAをアルカリ法(「ラボマニュアル遺伝子工学」丸善(株)、第51~53頁、1988)で調製し、変異エピモルフィン改変体をコードするDNAの塩基配列をDNAシーケンサーで解析した。これによってコードされるアミノ酸配列を決定し、実施例10で得られた対応する変異エピモルフィン改変体のアミノ酸配列として決定した。

【0052】[実施例9]

変異エピモルフィン改変体の細胞接着能の評価

(1) 実施例10で調製した変異エピモルフィン改変体(8MUrea/Lysisバッファーに懸濁しているもの)を浮遊培養ディッシュに10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>になるように塗布し、乾燥後、8MUrea/Lysisバッファーで1回洗った。その後、PBSでディッシュを5回洗い、培養細胞CH3/10T1/2clone8を、BSAが20mg/ml添加されたD-MEM/F-12培地(SIGMA D8900)を用いてディッシュにまいた。

(2) 1時間後に、ディッシュをPBSで3回洗った後、0.5N NaOHを用いて細胞を回収した。そのDNA量を反映するOD260nmの値を分光光度計で測定した。変異していないエピモルフィン改変体の吸光度が0.33 $\pm$ 0.015であるのに対して、ほぼこの範囲の吸光度が得られた変異体は6種あった。これより、エピモルフィン改変体には、一部のアミノ酸配列を変異させたものが許容されることが判明した。上記実施例10~12で作成し、評価した変異マウスエピモルフィン改変体の変異した部分は、表2に示す通りであった。

【0053】

【表2】

| 変異体 | 変異位置 (* 1) | 元のアミノ酸 | 変異したアミノ酸 |
|-----|------------|--------|----------|
| a   | 149 番目     | Ile    | Val      |
|     | 175 番目     | Ser    | Pro      |
| b   | 175 番目     | Ser    | Thr      |
| c   | 115 番目     | Ile    | Val      |
|     | 127 番目     | Phe    | Leu      |
|     | 130 番目     | Val    | Ala      |
|     | 131 番目     | Met    | Thr      |
|     | 139 番目     | Ile    | Val      |
|     | 154 番目     | Glu    | Val      |
|     | 166 番目     | Glu    | Asp      |
|     | 177 番目     | Phe    | Leu      |
| d   | 134 番目     | Tyr    | Phe      |
|     | 171 番目     | Ser    | Gly      |
|     | 178 番目     | Ile    | Thr      |
|     | 179 番目     | Ser    | Pro      |
|     | 180 番目     | Asp    | Gly      |
| e   | 133 番目     | Glu    | Val      |
|     | 145 番目     | Ser    | Gly      |
|     | 155 番目     | Ile    | Asn      |
|     | 162 番目     | Asp    | Gly      |
|     | 177 番目     | Phe    | Ser      |
| f   | 122 番目     | Asp    | Gly      |
|     | 115 番目     | Ile    | Leu      |
|     | 131 番目     | Met    | Val      |
|     | 155 番目     | Ile    | Phe      |

(\* 1) マウスエピモルフィン全長のN末端から数えた番号である。

#### 【0054】

【発明の効果】本発明によれば、エピモルフィンの活性を高度に保持し、しかも調製及び精製が容易なエピモルフィン改変体が提供される。また、本発明によれば、エピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、アミノ酸の部分的な置換、欠失または挿入がなされた変異体が提供される。さらに、本発明によれば、エピモルフィン改変体及び変異エピモルフィン改変体をコードするDNAが提供される。本発明のエピモルフィン改変体及びその変異体は、生理的溶液に可溶性であるため、大量生産が可能で、精製も容易である。本発明のエピモルフィン改変体及びその変異体は、エピモルフィン本来の活性を高いレベルで保持しており、医療をはじめとする種々の用途、例えば、火傷や手術後の各種組織の治療や人工臓器等に直接利用できるほか、化粧品、育毛剤等の成分として有用である。

【0055】本発明及びその好ましい実施態様は、以下のとおりである。

1. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドの少なくとも一方の端部に5~99個の範囲のアミノ酸よりなる親水性ペプチドが付加されていることを特徴とするエピモルフィン改変体。

2. エピモルフィンの機能ドメインが、エピモルフィン全長からN末端側のコイルドコイル領域(1)、C末

\* 端側のコイルドコイル領域(3)、及びC末端側の疎水性領域を削除した中央フラグメント(2)として定義されるものである第1項記載のエピモルフィン改変体。

3. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長である第1項または第2項記載のエピモルフィン改変体。

【0056】4. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長の少なくとも一方の端部より一部のアミノ酸を削除したフラグメントである前記第1項または第2項記載のエピモルフィン改変体。

5. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の少なくとも一部のアミノ酸を削除したフラグメントaである第4項記載のエピモルフィン改変体。

6. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長からC末端側の疎水性領域を削除したフラグメントbである第4項記載のエピモルフィン改変体。

【0057】7. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長からC末端側の疎水性領域を削除すると共に、N末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の少なくとも一部のアミノ酸を削除したフラグメントcである第4項記載のエピモルフィン改変体。

8. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長からC末端側の疎水性領域を削除すると共に、C末端側よりそのコイルドコイル領域(3)の少なくとも一部のアミノ酸を削除したフラグメントdである第4項記載のエピモルフィン改変体。

9. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、エピモルフィン全長からC末端側の疎水性領域を削除すると共に、N末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の少なくとも一部のアミノ酸を削除し、かつ、C末端側よりそのコイルドコイル領域(3)の少なくとも一部のアミノ酸を削除したフラグメントeである第4項記載のエピモルフィン改変体。

【0058】10. エピモルフィン全長の両端に親水性ペプチドが付加されている第3項記載のエピモルフィン改変体。

11. フラグメントaの両端部のうちの少なくともN末端側に親水性ペプチドが付加されている第5項記載のエピモルフィン改変体。

12. フラグメントbの両端部のうちの少なくともN末端側に親水性ペプチドが付加されている第6項記載のエピモルフィン改変体。

13. フラグメントcの両端部のうちの少なくともN末端側に親水性ペプチドが付加されている第7項記載のエピモルフィン改変体。

14. フラグメントdの両端部のうちの少なくともC末端側に親水性ペプチドが付加されている第8項記載のエピモルフィン改変体。

15. 親水性ペプチドが、結合親水性アミノ酸を50%以上の割合(個数基準)で含有するものである第1項ないし第14項のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【0059】16. 親水性ペプチドが、下記の(a)~(h)で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸配列を含有するものである第1項ないし第15項のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

(a) Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala

(b) Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn

(c) Glu-Tyr-Lys-Glu-Glu-Glu-Glu-Lys

(d) Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys

(e) Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys

(f) Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly-Arg

(g) Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pr

o-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp

(h) Gly-Ala-Pro-Val-Pro-Tyr-Asp-Pro-Leu-Glu-Pro-Arg  
【0060】17. 親水性ペプチドが、少なくとも5個の連続したヒスチジン残基を含有するものである第1項ないし第15項のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

18. エピモルフィンが、ヒトエピモルフィンである第1項ないし第17項のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

19. ヒトエピモルフィンが、後記配列表の配列番号1のエピモルフィン、配列番号2のエピモルフィンアイソフォームA、及び配列番号3のエピモルフィンアイソフォームBから選ばれる1種である第18項記載のエピモルフィン改変体。

20. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、少なくともヒトエピモルフィンのN末端側より99~189番目のアミノ酸配列を含有するものである第18項または第19項記載のエピモルフィン改変体。

【0061】21. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、少なくともヒトエピモルフィンのN末端側より104~187番目のアミノ酸配列を含有するものである第18項または第19項記載のエピモルフィン改変体。

22. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、ヒトエピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の1~28個の範囲内のアミノ酸を削除し、かつ、C末端側の疎水性領域を削除したフラグメントである第18項または第19項記載のエピモルフィン改変体。

23. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、ヒトエピモルフィン全長のN末端側から29~103個の範囲内のアミノ酸を削除したものである第18項または第19項記載のエピモルフィン改変体。

24. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、ヒトエピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の29~77個の範囲内のアミノ酸を削除し、かつ、C末端側の疎水性領域を削除したフラグメントである第23項記載のエピモルフィン改変体。

【0062】25. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、ヒトエピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の78~103個の範囲内のアミノ酸を削除し、かつ、C末端側の疎水性領域を削除したフラグメントである第23項記載のエピモルフィン改変体。

26. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、ヒトエピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の30~98個の範囲内のアミノ酸を削除し、かつ、C末端側の疎水性領域を削除し

10

20

30

40

50

たフラグメントである第18項または第19項記載のエピモルフィン改変体。

27. エピモルフィンがマウスエピモルフィンである第1項ないし第17項のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

28. マウスエピモルフィンが、後記配列表の配列番号4のエピモルフィン、配列番号5のエピモルフィンアイソフォームA、及び配列番号6のエピモルフィンアイソフォームBから選ばれる1種である第27項記載のエピモルフィン改変体。

【0063】29. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、少なくともマウスエピモルフィンのN末端側より100～190番目のアミノ酸配列を含有するものである第27項または第28項記載のエピモルフィン改変体。

30. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、少なくともマウスエピモルフィンのN末端側より105～188番目のアミノ酸配列を含有するものである第27項または第28項記載のエピモルフィン改変体。

31. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、マウスエピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の1～29個の範囲内のアミノ酸を削除し、かつ、C末端側の疎水性領域を削除したフラグメントである第27項または第28項記載のエピモルフィン改変体。

【0064】32. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、マウスエピモルフィン全長のN末端側から30～104個の範囲内のアミノ酸を削除したものである第27項または第28項記載のエピモルフィン改変体。

33. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、マウスエピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の30～78個の範囲内の \*

#### 配列

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Asp | Arg | Leu | Pro | Asp | Leu | Thr | Ala | Cys | Arg | Lys | Asn | Asp | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gly | Asp | Thr | Val | Val | Val | Val | Glu | Lys | Asp | His | Phe | Met | Asp | Asp | Phe |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |
| Phe | His | Gln | Val | Glu | Glu | Ile | Arg | Asn | Ser | Ile | Asp | Lys | Ile | Thr | Gln |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |
| Tyr | Val | Glu | Glu | Val | Lys | Lys | Asn | His | Ser | Ile | Ile | Leu | Ser | Ala | Pro |
|     |     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |
| Asn | Pro | Glu | Gly | Lys | Ile | Lys | Glu | Glu | Leu | Glu | Asp | Leu | Asn | Lys | Glu |
|     |     |     | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     | 80  |     |
| Ile | Lys | Lys | Thr | Ala | Asn | Lys | Ile | Arg | Ala | Lys | Leu | Lys | Ala | Ile | Glu |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |
| Gln | Ser | Phe | Asp | Gln | Asp | Glu | Ser | Gly | Asn | Arg | Thr | Ser | Val | Asp | Leu |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |
| Arg | Ile | Arg | Arg | Thr | Gln | His | Ser | Val | Leu | Ser | Arg | Lys | Phe | Val | Glu |

\* アミノ酸を削除し、かつ、C末端側の疎水性領域を削除したフラグメントである第32項記載のエピモルフィン改変体。

34. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、マウスエピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の79～104個の範囲内のアミノ酸を削除し、かつ、C末端側の疎水性領域を削除したフラグメントである第32項記載のエピモルフィン改変体。

10 【0065】35. エピモルフィンの機能ドメインを含むポリペプチドが、マウスエピモルフィン全長からN末端側よりそのコイルドコイル領域(1)の30～99個の範囲内のアミノ酸を削除し、かつ、C末端側の疎水性領域を削除したフラグメントである第27項または第28項記載のエピモルフィン改変体。

36. 第1項ないし第35項のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体をコードするDNA。

37. 第1項ないし第35項のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、該エピモルフィン改変体の元の配列が有する機能を保持する程度に、部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされた変異エピモルフィン改変体。

38. 第37項に記載の変異エピモルフィン改変体をコードするDNA。

39. 分子間架橋されて複合体化されたものである第1項ないし第35項のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

#### 【0066】

#### 【配列表】

30 配列番号: 1  
配列の長さ: 288  
配列の型: アミノ酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: ペプチド

25 26  
 115 120 125  
 Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
 130 135 140  
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe  
 165 170 175  
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
 180 185 190  
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile  
 195 200 205  
 Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr  
 210 215 220  
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Thr  
 245 250 255  
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ile Ala Val Ser Val  
 260 265 270  
 Val Leu Val Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Gly Leu Ser Val Gly Lys  
 275 280 285

【0067】配列番号：2

配列の長さ：287

配列の型：アミノ酸

\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

\*

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro. Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe  
 20 25 30  
 Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln  
 35 40 45  
 Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro  
 50 55 60  
 Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu  
 85 90 95  
 Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu  
 100 105 110  
 Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu  
 115 120 125  
 Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
 130 135 140  
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe  
 165 170 175  
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
 180 185 190  
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile

27 28

195 200 205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr

210 215 220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr

225 230 235 240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Thr

245 250 255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Leu Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Ile

260 265 270

Val Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser

275 280 285

【0068】配列番号：3

\* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：277

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp

1 5 10 15

Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe

20 25 30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln

35 40 45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro

50 55 60

Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu

65 70 75 80

Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu

85 90 95

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu

100 105 110

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu

115 120 125

Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser

130 135 140

Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr

145 150 155 160

Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe

165 170 175

Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn

180 185 190

Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile

195 200 205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr

210 215 220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr

225 230 235 240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr

245 250 255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn His Ile Pro

260 265 270



29

30

Arg Ala Ile Tyr Pro

275

【0069】配列番号：4

配列の長さ：289

配列の型：アミノ酸

\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

\*

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly  
 20 25 30  
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala  
 50 55 60  
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile  
 85 90 95  
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp  
 100 105 110  
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val  
 115 120 125  
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg  
 130 135 140  
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile  
 165 170 175  
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu  
 180 185 190  
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser  
 195 200 205  
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu  
 210 215 220  
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys  
 245 250 255  
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ala Ala Val Ala  
 260 265 270  
 Val Ala Val Ile Ala Val Leu Ala Leu Ile Ile Gly Leu Ser Val Gly  
 275 280 285

Lys

【0070】配列番号：5

配列の長さ：288

配列の型：アミノ酸

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly

31 20 25 30 32

Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala  
 50 55 60  
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile  
 85 90 95  
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp  
 100 105 110  
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val  
 115 120 125  
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg  
 130 135 140

Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile  
 165 170 175  
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu  
 180 185 190  
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser  
 195 200 205  
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu  
 210 215 220  
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys  
 245 250 255  
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Val Met Phe Val Leu Ile Cys Val  
 260 265 270  
 Val Thr Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ser  
 275 280 285

【0071】配列番号：6

配列の長さ：279

配列の型：アミノ酸

\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

\*

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly  
 20 25 30  
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala  
 50 55 60  
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile  
 85 5090 95

33 34

Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp  
100 105 110

Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val  
115 120 125

Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg  
130 135 140

Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr  
145 150 155 160

Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile  
165 170 175

Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu  
180 185 190

Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser  
195 200 205

Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu  
210 215 220

Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser  
225 230 235 240

Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys  
245 250 255

Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln  
His Cys His Ser Asn Arg Thr  
260 265

270

Pro Arg Ala Leu Cys Pro Arg  
275

## 【図面の簡単な説明】

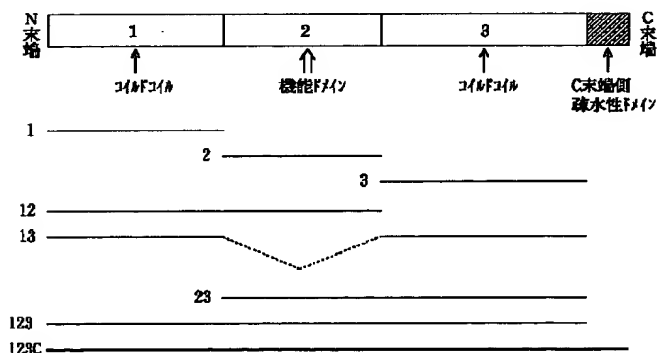
【図 1】 エピモルフィンの構造上の特徴と、各フラグメントの設計を示す図である。

【図 2】 大腸菌を用いて、図 1 に示す各フラグメントを作成し、SDS-PAGE の電気泳動で解析した図である。

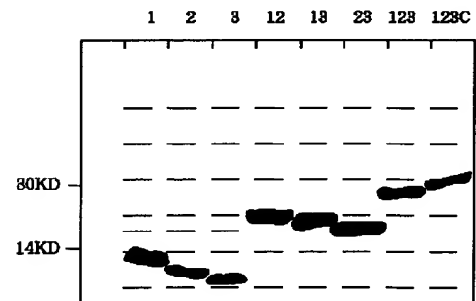
\* 【図 3】 エピモルフィンの機能部位に結合する抗体を用いて、図 2 に示す各フラグメントから、機能を有するエピモルフィンフラグメントを検出した結果を示す図である。

【図 4】 実施例 4 で使用した各エピモルフィンフラグメントの設計図である。

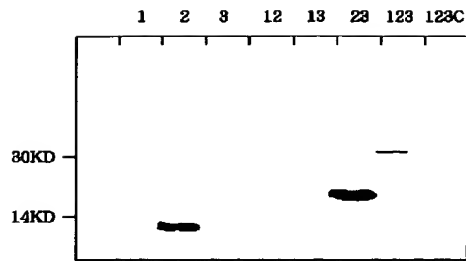
【図 1】



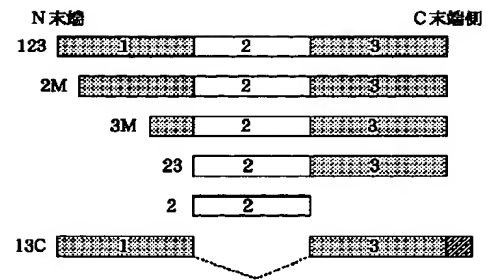
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

C 1 2 R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所